

## 実験的誘発舌癌における脈管新生に関する検討 —特に血管密度とリンパ管密度の推移の比較について—

金沢大学大学院医学系研究科がん医科学専攻細胞浸潤学  
(旧講座名：歯科口腔外科学)  
(主任：山本悦秀教授)

中 谷 弘 光

口腔扁平上皮癌の浸潤増殖における腫瘍血管および腫瘍リンパ管の変化とその意義を解明する目的として、ジメチルベンズアントラセン (9,10-dimethyl 1,2-benzanthracene, DMBA) アセトン溶液誘発ハムスター舌癌の血管およびリンパ管密度を検討した。正常粘膜から癌化するまでの経時的変化をみるために、発癌操作後2週目、6週目、12週目に屠殺した。また、12週目以降も継続し、ハムスターの体重が減少し、悪液質の所見がみられた時点で順次屠殺した。なお、屠殺の際は全身麻酔下に行大動脈より血管内染色液を注入し、採取した組織片より、10 $\mu$ mの新鮮凍結標本を作製した。その後5'-nucleotidase (5'-Nase) 染色を行いリンパ管を染色し、血管とリンパ管像を観察した。正常粘膜から癌化するまでの経時的変化において、血管は経時的に増加する傾向であった。またリンパ管は、ほとんど変化がなく、全体的に増減は認められなかった。血管およびリンパ管密度を浸潤様式別に検討したところ、血管密度においては、浸潤傾向が高度になるにつれ血管密度は低くなる結果であった。(P<0.01) リンパ管密度では、1, 2, 3型よりも4C型にリンパ管密度が高くなる傾向がみられた。癌細胞における血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)-Cの発現を浸潤様式別に検討した結果では、浸潤様式が高度になるほどVEGF-Cの発現も高度になった (p<0.01)。しかし、VEGF-Cの発現とリンパ管密度との関連性はみられなかった。以上の結果より、口腔扁平上皮癌における血管新生およびリンパ管新生は、癌の浸潤・増殖により影響を受けることが示唆された。

**Key words** angiogenesis, lymphangiogenesis, blood and lymph vessel densities, mode of cancer invasion, vascular endothelial growth factor

近年、口腔癌の治療成績は診断、治療技術の進歩により向上しつつあり、5年生存率は60～80%に達している<sup>1)</sup>。しかし、いまだ高度浸潤癌の予後は悪く、原発巣や頸部リンパ節転移を制御できずに不幸な転帰をとることも少なくない。中でも舌癌では後発転移を含め頸部リンパ節の転移頻度が高く25～40%で、その制御の如何は本症の予後を直接に左右する。また、悪性度と関連する所見の中で、癌の深部への浸潤像が転移や予後と密接に関係しているとの報告が多くみられ<sup>2)~4)</sup>、その浸潤様式が重要な予後因子の一つとして注目されている。Yamamotoら<sup>5)</sup>は癌浸潤様式分類とリンパ節転移形成率との関連で、高浸潤になるほど転移形成率が高かったと報告している<sup>6)</sup>。リンパ節転移形成において、原発部でのリンパ管侵襲など所属リンパ節転移を予測する方法が検討されてきたが、通常の臨床病理組織学的な検索で用いられるヘマトキシリン・エオジン染色標本では毛細リンパ管と静脈、毛細血管、組織間隙との鑑別は容易ではないため、リンパ管侵襲の病理組織学的な評価は困難である<sup>7)</sup>。また、血管新生は腫瘍の増殖や進展において不可欠<sup>8)</sup>とされており、それに主要な役割を果たす血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) の発現は多くの癌で独立した予後因子<sup>9)~10)</sup>とされている。さらに血管新生は、新

生された血管によって癌細胞が血管に侵入し易くなることから、血行性の遠隔転移とも関与しているものと推察される。口腔癌における血行性転移としては主に、肺や咽頭、骨などが頻度の高い臓器と考えられているが、その頻度は低く一般には腺癌や肉腫に多いとされている。

一方、リンパ節転移は口腔癌の悪性度に最も関連する因子の一つであり、リンパ節転移の制御は臨床において重要な治療戦略である。かつて、リンパ管は腫瘍内に存在しないと考えられており、腫瘍リンパ管新生とリンパ節転移の関連は否定されてきた<sup>11)</sup>、既存のリンパ管は、リンパ節への転移に十分であるという考えが主流であったが、1995年にKaipainenら<sup>12)</sup>によりVEGF-Cが血管およびリンパ管内皮細胞増殖因子であることが報告されて以来、VEGF-Cの腫瘍内発現とリンパ節転移の相関が、胃・大腸・肺・前立腺・甲状腺癌など<sup>13)~17)</sup>、さまざまな癌で報告されている。さらに、VEGF-Cが過剰発現した乳癌などでは、リンパ管新生を認めている<sup>18)</sup>。口腔癌においては、血行性転移よりもリンパ節転移が主体であり、リンパ節転移と予後が密接な関係にあることから、血管新生のみならずリンパ管新生も浸潤や転移に関与している可能性が高い。

本研究では、口腔扁平上皮癌における血管新生およびリンパ

平成15年11月4日受付、平成15年12月10日受理

Abbreviations : ALP, alkaline phosphatase; DMBA, 9,10-dimethyl-1, 2-benzanthracene; 4NQO, 4-nitroquinoline1-oxide; 5'-Nase, 5'-nucleotidase; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; VEGF, vascular endothelial growth factor

Table 1. Changes in blood vessel densities in the process of carcinogenesis

Week	No. of hamster	Blood vessels ( $\bar{X} \pm SD$ )
0	5	6.9 $\pm$ 1.4
2	5	9.8 $\pm$ 1.3 <sup>a)</sup>
6	5	11.5 $\pm$ 1.0 <sup>b)</sup>
12	5	13.6 $\pm$ 1.5 <sup>c)</sup>

Blood vessel density increased in a time-dependent manner from normal mucosa to cancerization.

a)  $p < 0.01$ , compared with 0 week.

b)  $p < 0.01$ , compared with 0 week, 2 week.

c)  $p < 0.01$ , compared with 0 week, 2 week, 6 week.

Table 2. Changes in lymph vessel densities in the process of carcinogenesis

Week	No. of hamster	Lymph vessels ( $\bar{X} \pm SD$ )
0	5	9.2 $\pm$ 1.4
2	5	9.3 $\pm$ 0.8
6	5	9.5 $\pm$ 1.1
12	5	9.7 $\pm$ 1.8

Lymph vessel density did not increase during carcinogenesis.

Table 3. Relationship between mode of invasion and blood vessel densities

Mode of invasion	No. of hamster	Blood vessels ( $\bar{X} \pm SD$ )
1	8	24.1 $\pm$ 3.0
2	8	21.1 $\pm$ 3.2 <sup>a)</sup>
3	15	12.0 $\pm$ 3.8 <sup>b)</sup>
4C	5	9.4 $\pm$ 4.7 <sup>c)</sup>

As tumor invasion progressed, the blood vessel density decreased.

a)  $p < 0.01$ , compared with grade 1.

b)  $p < 0.01$ , compared with grade 1, 2.

c)  $p < 0.01$ , compared with grade 1, 2, and  $p < 0.05$ , compared with grade 3.

Table 4. Relationship between mode of invasion and lymph vessel densities

Mode of invasion	No. of hamster	Lymph vessels ( $\bar{X} \pm SD$ )
1	8	15.3 $\pm$ 2.7
2	8	13.2 $\pm$ 5.0
3	15	11.9 $\pm$ 4.3 <sup>a)</sup>
4C	5	17.6 $\pm$ 5.4 <sup>b)</sup>

Lymph vessel density was higher in grade 4C than in grades 2, 3.

a)  $p < 0.01$ , compared with grade 1.

b)  $p < 0.01$ , compared with grade 2, 3.

管新生と腫瘍の浸潤や増殖の関係を明らかにする目的で、ジメチルベンズアントラセン (9, 10-dimethyl 1, 2-benzanthracene, DMBA) アセトン溶液誘発ハムスター舌癌モデルを用いて、腫瘍発生までの血管密度およびリンパ管密度の経時的な推移を観察するとともに、浸潤癌における腫瘍血管、リンパ管密度と腫瘍浸潤増殖動態およびVEGF-Cの発現との関係について検討した。

## 材料および方法

### I. 実験動物

実験には6週齢・雄・体重約80 gのシリアン系ゴールデンハムスター (栗津実験動物, 摂津) を60匹1週間予備飼育の後に使用した。飼料は実験動物用固形飼料MF (オリエンタル酵母, 東京) を、飲料水は水道水をそれぞれ自由摂取させた。

Table 5. Relationship between blood vessel density and PCNA labeling index

Degree of blood vessel density*	No. of hamster	PCNA labeling index ( $\bar{X} \pm SD$ )
Rich	15	15.2 $\pm$ 4.1
Moderate	14	19.1 $\pm$ 5.9 <sup>a)</sup>
Poor	7	23.8 $\pm$ 5.8 <sup>b)</sup>

\*Poor<10; 10≤Moderate≤20; Rich>20.

The PCNA positive rate decreased as vessel density increased.

a)  $p < 0.01$ , compared with rich density.

b)  $p < 0.01$ , compared with rich, moderate density.

Table 6. Relationship between mode of invasion and PCNA labeling index

Mode of invasion	No. of hamster	PCNA labeling index ( $\bar{X} \pm SD$ )
1	8	14.5 $\pm$ 4.4
2	8	16.5 $\pm$ 3.0
3	15	20.3 $\pm$ 6.6 <sup>a)</sup>
4C	5	23.1 $\pm$ 5.6 <sup>b)</sup>

The PCNA positive rate increased as mode of invasion increased.

a)  $p < 0.01$ , compared with grade 1.

b)  $p < 0.01$ , compared with grade 1, 2.

Table 7. Relationship between mode of invasion and VEGF-C expression

Mode of invasion	No. of hamster	Intensity of VEGF-C expression (%)		
		Low	Medium	High
1	8	4 (50.0)	4 (50.0)	0
2	8	3 (37.5)	4 (50.0)	1 (12.5)
3	15	3 (20.0)	8 (53.3)	4 (27.7)
4C	5	0	1 (20.0)	4 (80.0)

The expression of VEGF-C was higher as tumor invasion progressed, and correlated closely with the mode of invasion,  $p < 0.01$ ,  $r = 0.579$  ( $r$ , correlation coefficient.)

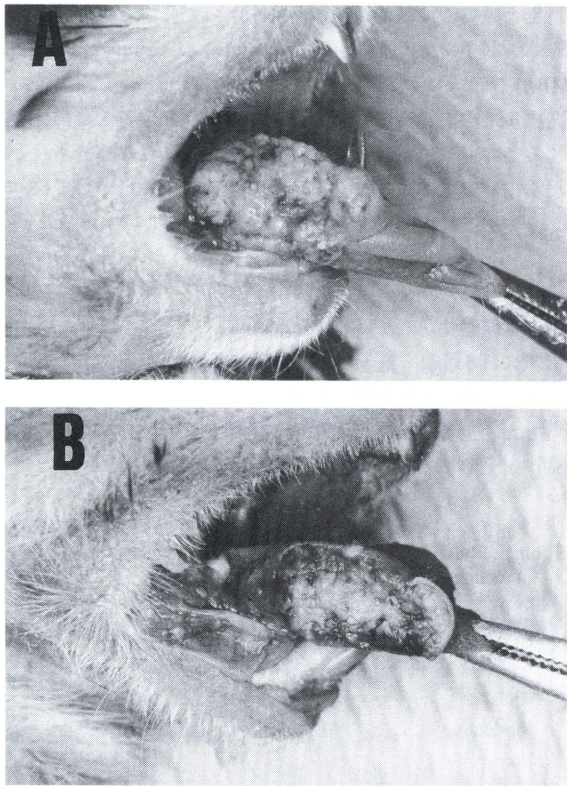


Fig. 1. Macroscopic appearance of the induced tongue carcinoma by DMBA. (A) Exophytic type. (B) Endophytic type.

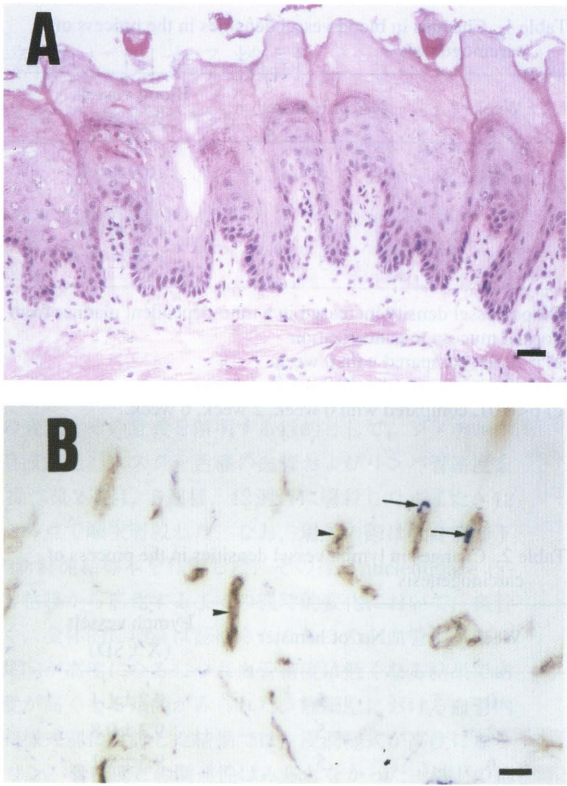


Fig. 3. Photomicrographs of hamster tongue 6 weeks after treatment. (A) HE stain, (B) Blood and lymph vessel stains, blood vessel (blue stain, arrows) and lymph vessel (brown stain, arrowheads). Scale bar indicates 50 $\mu$ m.

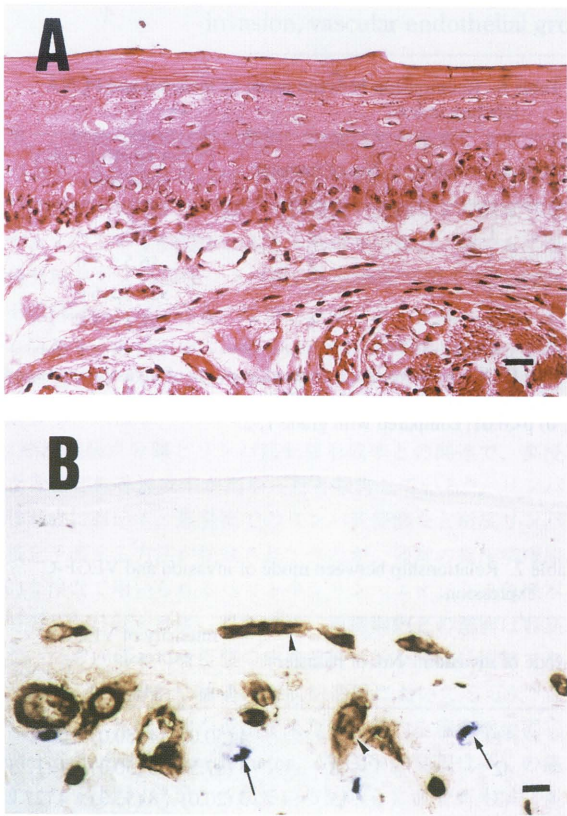


Fig. 2. Photomicrographs of a normal hamster tongue. (A) HE stain, (B) Blood and lymph vessel stains, blood vessel (blue stain, arrows) and lymph vessel (brown stain, arrowheads) in normal tissue. Scale bar indicates 50 $\mu$ m.

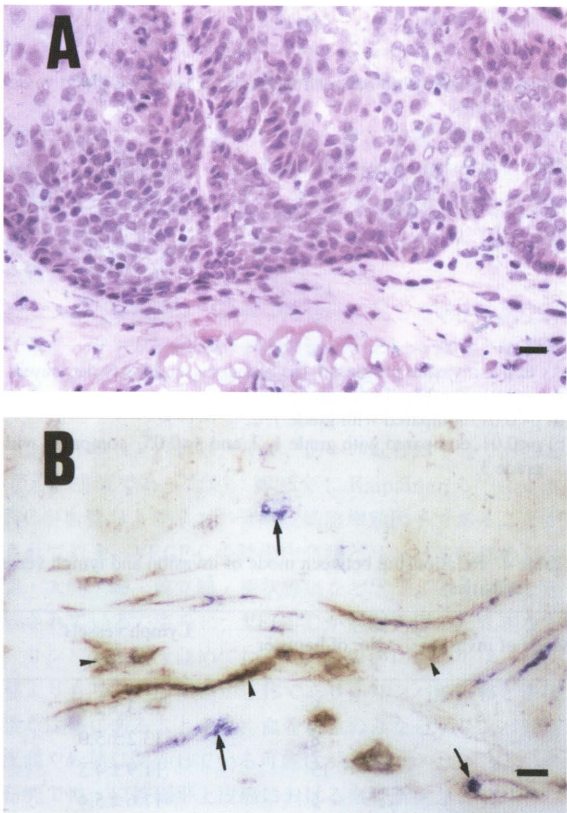


Fig. 4. Photomicrographs of hamster tongue 12 weeks after treatment. (A) HE stain, (B) Blood and lymph vessel stains, blood vessel (blue stain, arrows) and lymph vessel (brown stain, arrowheads). Scale bar indicates 50 $\mu$ m.



## Ⅱ. 発癌方法

発癌剤として1.0% DMBA (和光純薬工業, 大阪) アセトン溶液を使用し, 発癌方法はFujitaら<sup>19)</sup>の方法に従った。すなわち, エーテル麻酔下に週3回60匹のハムスターの右側舌縁部を歯科用クレンザーで数回擦過した後, 発癌剤の塗布を行った。60匹のうち20匹は, 発癌の経時的な変化における血管およびリンパ管密度の変化を観察する目的で0週目(無処置), 2週目, 6週目, 12週目に屠殺した。また, 12週目以降で発癌が確認されることから<sup>20)</sup>残りの40匹は, 浸潤癌の血管およびリンパ管密度を観察する目的で発癌操作を12週目以降も継続し, ハムスターの体重が減少し, 悪液質の所見がみられた時点で順次屠殺した。なお, 全てのハムスターは屠殺1週間前より放置し, 発癌操作による創傷治癒を待ってから屠殺した。

## Ⅲ. 血管内染色法

5%ペントバルビタール溶液(大日本製薬, 大阪)をハムスター腹腔内に0.5ml投与し, 全身麻酔を施した上で血管内染色法を行った。すなわち開胸後, 左心室から上行大動脈に20ゲージのカテーテルを挿入し4-0ナイロン糸で結紮固定するとともに, 左右の心耳を切開し血液および注入剤の流出路を確保した。次に, 40℃に加温した生理食塩水90~100mmHgの注入圧でカテーテルより10分間注入し, 十分に還流および瀉血を行った。その後, 血管内染色液(精製水, 97g; ポリビニルピロリドン, 2g; Coomassie Brilliant Blue-250, 1g)を同圧でカテーテルより20分間注入し, 舌および口腔粘膜が十分に染色され

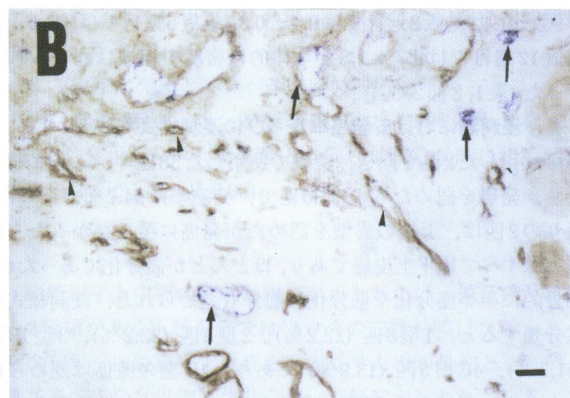
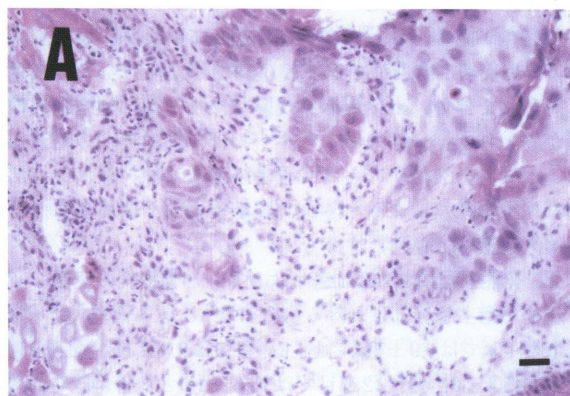


Fig. 5. Photomicrographs of hamster tongue carcinomas. (A) HE stain, (B) Blood and lymph vessel stains, blood vessel (blue stain, arrows) and lymph vessel (brown stain, arrowheads) in the tumor tissue at the invasion front. Scale bar indicates 50 $\mu$ m.

るのを確認した。還流後, 15分間ハムスターを静置し, 舌を周囲組織と一塊として切除した。

## Ⅳ. 組織標本の作製法

切除した組織片は, すべて OCT (optimal cutting temperature) コンパウンドに包埋し液体窒素で凍結させ, 4 $\mu$ mと10 $\mu$ mの新鮮凍結切片を作製した。4 $\mu$ mの切片については, HE染色と増殖細胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) および VEGF-C の免疫組織化学染色を行った。また10 $\mu$ mの切片は, 5'-nucleotidase (5'-Nase) 染色と血管内染色の二重染色を行い微小血管および微小リンパ管密度の観察を行った。

## Ⅴ. リンパ管染色法 (5'-Nase 染色)

10 $\mu$ mの新鮮凍結切片を, 4%パラホルムアルデヒド溶液にて40分間固定後, Katoら<sup>21)</sup>の方法に従って5'-Nase染色液(0.2M Tris-malate buffer, 20ml; distilled water, 22ml; 0.1M MgSO<sub>4</sub>, 5ml; 2% Pb (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 3ml; AMP, 25mg; L-tetramisole, 15mg; sucrose, 3.5g)に37℃で60分間浸漬した。その後, 蒸留水で十分に洗浄したのち, 1%硫化アンモニウム溶液に室温で1分間浸漬してリンパ管を発色した。

## Ⅵ. 免疫組織化学染色法

新鮮凍結切片を-20℃の冷アセトン溶液にて10分間固定した後, 1%過ヨウ素酸に5分間浸漬して内因性ペルオキシダーゼをブロックし, Protein block serum-free (ダコ・ジャパン, 東京)により非特異的反応のブロック後, 一次抗体として, マウ

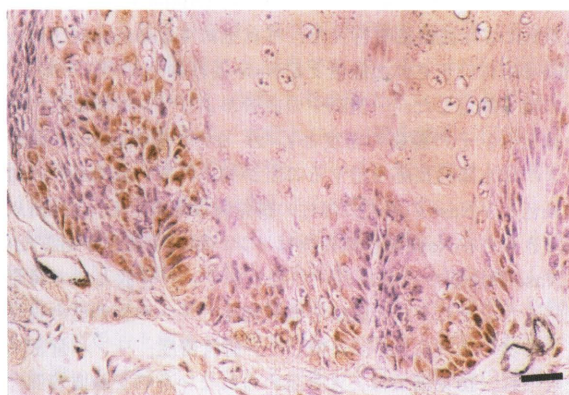


Fig. 6. Immunohistochemical staining for PCNA in case of invasive cancer. PCNA-positive cells are shown with dark nuclei. Scale bar indicates 100 $\mu$ m

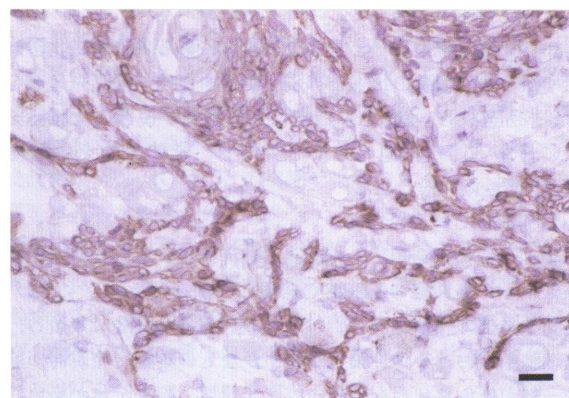


Fig. 7. Immunohistochemical staining for VEGF-C. Positive staining of VEGF-C in the cytoplasm cancer cells. Scale bar indicates 100 $\mu$ m.

ス抗ヒトPCNAモノクローナル抗体(ダコ・ジャパン)およびウサギ抗ヒトVEGF-Cポリクローナル抗体(免疫生物研究所, 群馬)を各々50倍に希釈して用いた。二次抗体には, PCNAに対してヤギ抗マウスIgG抗体(ダコ・ジャパン)を用い, 室温中で1時間反応させた。その後, ラベルドストレプトアビジン・ビオチン・ペルオキシダーゼ複合体(ダコ・ジャパン)を20分間反応させた。VEGF-Cに対しては, Envisionポリマー試薬(k5027 ダコ・ジャパン)を1時間反応させた。発色には, それぞれ0.02%ジアミノベンチジンテトラハイドロクロライド(3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride)(和光純薬工業, 大阪)を用い発色させた。核染色には, ヘマトキシリンを使用した。また陰性対照として一次抗体を含まないリン酸緩衝液を使用し, 上記と同様の方法で反応を行った。

## Ⅶ. 検討項目と評価方法

### 1. 癌浸潤様式分類

癌浸潤様式は, Yamamoto-Kohama分類<sup>5)</sup>に準じて分類した。すなわち, 浸潤先進部の組織像を光顕的に観察し, 腫瘍と間質との境界線が明瞭のものを1型, 境界線にやや乱れがあるものを2型, 境界線が不明瞭で大小の腫瘍胞巣が散在性に認めるものを3型, 小さな腫瘍胞巣が索状に浸潤するものを4C型, 腫瘍胞巣をつくらずび漫性に浸潤するものを4D型とした。

### 2. 血管密度およびリンパ管密度の測定

10 $\mu$ mの5'-Nase-血管内染色標本を用い, 血管およびリンパ管密度の測定を行った。すなわち, 各腫瘍の浸潤先進部を任意3ヶ所ずつ100倍に設定した光学顕微鏡(Nikon ECLIPSE E-600, 東京)にて写真撮影を行った。写真上にてCoomassie Brilliant Blue-205に染色された血管と5'-Nase陽性のリンパ管を判別し, その数を算定した。一視野中の血管およびリンパ管の数の平均を算定し, その腫瘍の密度とした。なお, 5'-Naseは, 血管やリンパ球も陽性反応を呈することが知られているため<sup>22)</sup>, 血管内染色と5'-Naseの両方に陽性の構造物は血管とし, 20 $\mu$ m以下の大きさの5'-Nase陽性構造物はリンパ球の可能性があるため, 5'-Nase構造物から差し引いて残りをリンパ管数として算定した。また, それぞれの腫瘍を血管密度, リンパ管密度の程度によって次のように3群に分類した。血管密度, リンパ管密度がそれぞれ, 10未満でほとんど認められないものを疎血管群, 疎リンパ管群, 10以上20未満のものを中等度血管群, 中等度リンパ管群, 20以上で血管およびリンパ管数が多いものを富血管群, 富リンパ管群とした。

### 3. PCNA陽性細胞率

40匹の浸潤癌を用い, 抗PCNA抗体による免疫組織化学染色標本から陽性細胞の比率を算定した。すなわち浸潤先進部を任意3ヶ所選択し, 200倍に設定した顕微鏡下視野の全腫瘍細胞数に対する陽性細胞の比率を算定し, その平均を各腫瘍のPCNA陽性細胞率とした。

### 4. VEGF-C発現の評価

40匹の浸潤癌を用い, 抗VEGF-C抗体による免疫組織化学染色標本から各腫瘍のVEGF-C発現の評価を行った。すなわち, 浸潤先進部の腫瘍細胞における発現程度を3段階に分類し, 腫瘍細胞中における陽性細胞がわずかなものを軽度発現群, 胞巣の一部が染色されたものを中等度発現群, 胞巣全体が染色されたものを高度発現群として評価した。

## Ⅷ. 統計学的解析法

有意差検定には一元配置分散分析法を用い, 有意差が認めら

れたものに対しては, FisherのPLSD法にて多重比較検定を行った。また相関解析にはSpearman順位相関係数検定を用いた。それらは5%未満の危険率をもって有意差ありとした。

## 成 績

### Ⅰ. 誘発舌癌モデルにおける発癌過程の変化

#### 1. 肉眼的所見

ハムスターの舌は, 実験開始直後から2週目までは処置を行っている右側舌縁部粘膜に異常所見は認められず, 擦過処置後に発赤や小さな潰瘍が見られたとしても, 次回処置時には完全に治癒していた。4週目には同部に肥厚が認められ, 色調もやや白色を呈するようになってきた。9週目になると同部に約1mm大の乳頭様小腫瘍を認めるものもみられ, 12週目には一部に肉眼的に発癌を認めるハムスターもみられた。その後, 腫瘍は増大進展し, 外向性のものや潰瘍を呈する内向性のものも認められた(図1)。15週目以降になると, 体重減少が著明になり悪液質の所見がみられるものも認められた。体重減少が著しいものから順次屠殺し, 遅くとも24週には屠殺した。

#### 2. 病理組織所見

ハムスターの正常舌は, 縦舌筋と横舌筋の筋組織で形成され, 血管は筋組織の間に点在していた。また, リンパ管の多くは紡錘状の脆弱な形態を呈し, 血管の近傍に散在性に存在していた(図2)。6週目になると上皮は肥厚し, 錯過角化を伴った異形上皮や上皮脚の伸長がみられた。有棘層には軽度の異型を伴った細胞が認められた。これらの変化に対応した血管の存在が認められ, 上皮下に存在していたリンパ管も, 肥厚に伴い変異, 消失がみられた(図3)。12週目では, 上皮は著しい角化を伴い, 上皮脚も不規則に伸長し, 棘細胞腫様の肥厚がみられた。一部のハムスターでは, 上皮下への浸潤傾向および細胞分裂像がみられ, 腫瘍の増殖に伴い腫瘍中心部に癌真珠や壊死組織が観察され, 腫瘍胞巣内や間質部に血管の破壊像も認めた(図4)。

### Ⅱ. 発癌過程における血管およびリンパ管密度の変化

腫瘍・宿主境界部における血管密度(±標準偏差)は, 無処置(0週目)では $6.9 \pm 1.4$ , 処置2週目では $9.8 \pm 1.3$ , 処置6週目では $11.5 \pm 1.0$ , 処置12週目では $13.6 \pm 1.5$ と血管は経時的に増加する傾向であった。一方リンパ管密度は, 無処置(0週目)では $9.2 \pm 1.4$ , 処置2週目では $9.3 \pm 0.8$ , 処置6週目では $9.5 \pm 1.1$ , 処置12週目では $9.7 \pm 1.8$ と全体的に密度の増減は認められなかった(表1, 2図2, 3, 4)。

### Ⅲ. 浸潤癌における発癌率ならびに浸潤様式別頻度

事故死した2匹を除き, 実験で使用した38匹のハムスターのうち, 発癌を認めたものは36匹で, 発癌率は94.7%であった。残りの2匹は, 上皮の異型を認めたが発癌に至らなかった。組織型はすべて扁平上皮癌であり, ほとんどが高分化であったが, 部分的に中等度分化や低分化の部分も認められた。浸潤様式別に分類すると, 1型8匹(22.2%), 2型8匹(22.2%), 3型15匹(41.7%), 4C型5匹(13.9%)であり, 4D型の腫瘍は認められなかった。発癌した36匹を発育形態により外向性腫瘍と内向性腫瘍に分け(図1), それぞれについて浸潤様式別に分類した。その結果, 外向性腫瘍28匹中, 浸潤様式1型8匹(28.6%), 2型8匹(28.6%), 3型11匹(39.2%), 4C型1匹(3.5%)。内向性腫瘍8匹中, 浸潤様式3型4匹(50%), 4C型4匹(50%) 1, 2型は認められなかった。



Ⅳ. 浸潤癌における血管およびリンパ管密度と浸潤様式の関係  
発育形態における血管およびリンパ管密度は、外向性腫瘍において血管密度  $18.1 \pm 5.8$ , リンパ管密度  $13.7 \pm 3.9$ , 内向性腫瘍においては、血管密度  $11.8 \pm 4.8$ , リンパ管密度  $12.3 \pm 3.8$  となり、血管およびリンパ管は外向性腫瘍に多くみられた。また、血管およびリンパ管密度を浸潤様式別に検討したところ、血管密度においては、1型  $24.1 \pm 3.0$ , 2型  $21.1 \pm 3.2$ , 3型  $12.0 \pm 3.8$ , 4C型  $9.4 \pm 4.7$  となり、浸潤傾向が高度になるにつれ血管密度は低くなる結果であった。リンパ管密度では、1型  $15.3 \pm 2.7$ , 2型  $13.2 \pm 5.0$ , 3型  $11.9 \pm 4.3$ , 4C型  $17.6 \pm 5.4$  となり1, 2, 3型よりも4C型にリンパ管密度高くなる傾向がみられた(表3, 図5)。また、統計学的にも血管およびリンパ管密度は癌浸潤様式に有意差が認められた ( $P < 0.01$ )。

#### V. PCNA陽性細胞率について

##### 1. PCNA陽性細胞率と血管密度の関係

癌細胞におけるPCNA陽性細胞の局在は、腫瘍と間質の境界部の腫瘍胞巣辺縁部に局在する傾向が認められた(図6)。PCNA陽性細胞率と血管密度との関係について検討したところ、疎血管群では陽性細胞率  $23.8 \pm 5.8$ , 中等度血管群では  $19.1 \pm 5.9$ , 富血管群では  $15.2 \pm 4.1$  であった(表5)。すなわち、細胞増殖活性が高度な腫瘍ほど血管密度が低下する傾向がみられた ( $P < 0.01$ )。

##### 2. PCNA陽性細胞率と浸潤様式との関係

PCNA陽性率と浸潤様式との関係について検討したところ、浸潤様式1型では陽性率  $14.5 \pm 4.4$ , 2型では陽性率  $16.5 \pm 3.0$ , 3型では陽性率  $20.3 \pm 6.6$ , 4C型では陽性率  $23.1 \pm 5.6$  であった(表6)。すなわち、浸潤様式が高度になるにつれてPCNA陽性率は高くなる傾向がみられた ( $P < 0.01$ )。

#### Ⅵ. VEGF-Cの発現について

##### 1. VEGF-C発現程度と浸潤様式について

癌細胞におけるVEGF-C陽性細胞の局在は、癌細胞の細胞質に多く認められた(図7)。また、血管内皮細胞においても、一部に陽性反応が認められた。VEGF-C発現と浸潤様式との関係について検討したところ、低浸潤癌の1, 2型においては軽度もしくは中等度発現群が多く、高浸潤癌の3, 4C型においては高度発現群が多く認められた(表7)。すなわち、浸潤傾向が高くなるにつれてVEGF-Cの発現も高度になる傾向が認められた。統計学的にもVEGF-C発現と浸潤様式との間に相関関係が認められた ( $P < 0.01$ )。

##### 2. VEGF-C発現とリンパ管密度の関係

VEGF-C発現とリンパ管密度について検討したところ、VEGF-C発現とリンパ管密度との間には統計学的に相関関係は認められなかった ( $P > 0.05$ )。

## 考 察

口腔扁平上皮癌の実験動物モデルとしては、誘発癌と移植癌の2種類がある。誘発癌ではマウスの口腔粘膜にコールタールを塗布し、口腔扁平上皮癌を発生させたのが最初とされ<sup>23)</sup>、以後さまざまな発癌物質<sup>24) 25)</sup>を用いて研究が行われている。中でもDMBA誘発ハムスター舌癌<sup>19)</sup>やニトロキノリンオキシド(4-nitroquinoline 1-oxide, 4NQO)誘発ラット舌癌<sup>26)</sup>は、舌癌の誘発が容易な実験系であることから、口腔扁平上皮癌の基礎的研究に広く用いられている。特に本研究で用いたDMBA誘発舌癌は、正常粘膜から癌化し、初期癌から浸潤癌までの経時的な

観察を行うことができ、転移に至るまでは時間を要するが、悪性度の異なる様々な癌が形成される<sup>20)</sup>。さらに発生部位が舌縁部であることから操作が容易であり、臨床の癌と類似していることが特徴である。実際に本研究では最も浸潤傾向の強い4D型は形成されなかったが、浸潤様式1型から4C型までの様々な浸潤癌を得ることができた。一方4NQO誘発ラット舌癌モデルでは、内向性発育の腫瘍において浸潤様式4C型、4D型の腫瘍が多く認められたとの報告<sup>26)</sup>があり、興味深いところである。また移植癌には、ハムスターの頬嚢に癌細胞を移植するハムスターのO-1N癌<sup>27)</sup>やKawashiriら<sup>28)</sup>が報告したヒト扁平上皮癌細胞株のスードマウス移植モデルなどがある。これらのモデルは癌細胞が生着、増殖すると高率にリンパ節転移を生じ、転移を研究する上で有用と考えられているが、発育様式や悪性度が均一しているため本研究の目的に適していないと考えられた。

*In vivo*におけるリンパ管同定に関する基礎的研究の古くは、色素穿刺注入法、過酸化水素処理法、加墨汁硝酸銀水局所動脈注入法などによって行われてきた<sup>29)~31)</sup>。しかしながら、これら1つの方法でのリンパ管同定は困難であった。近年、Katoら<sup>21)</sup>は5'-Naseがリンパ管の内皮細胞に強い活性を有し、血管の内皮細胞がアルカリフォスファターゼ(alkaline phosphates, ALP)に強陽性であることに着目し、これらを併せて5'-Nase-ALPase二重染色を考案した。この方法は、リンパ管の容易な観察法として有用であると報告されている<sup>21)</sup>。しかしながら、DMBA誘発舌癌では間質の炎症性細胞浸潤が高度のため、炎症性細胞のALP反応によるアゾ色素の発色が強く、5'-Naseの硫化アンモニウムによる発色と交錯して判別が困難となる<sup>32)</sup>。そこで本研究では、血管の同定に血管内染色法、リンパ管の同定に5'-Nase単染色を用い同一切片上で血管とリンパ管を算定する方法を用いた。その結果、血管とリンパ管を鮮明に区別することに成功した。本法は動物実験における、血管やリンパ管の研究において、非常に有用であると思われる。

腫瘍血管の研究において、血管構築は癌を栄養とする血管の分布、走行、形態、性状などを観察できることから多くの癌で研究されている。しかし、臨床例において十分にそれを観察することは手法上極めて困難であるため、もっぱら実験動物モデルを用いた検討がされている。茶谷<sup>33)</sup>は、口腔癌の浸潤と悪性度との関連で血管構築の変化を観察したところ、癌の浸潤能が腫瘍血管の形態を変化させている要因の1つであると報告している。また、臨床例における血管密度と癌の浸潤度や悪性度についての報告は多くみられ、浸潤や転移と相関を認めたとする報告<sup>34) 35)</sup>がある一方で、浸潤や転移と血管密度とは関係しないとの報告<sup>36) 37)</sup>もある。本研究の結果では、正常粘膜が癌化する過程においては血管新生が旺盛で血管密度も増加傾向にあるが、深部への浸潤が始まると減少する傾向がみられた。特に、浸潤様式3型、4C型などの高度浸潤癌においては、その傾向が顕著にみられ有意な差を認めている。これらの理由としては、腫瘍が増殖や伸展する過程において栄養を供給する上で腫瘍血管が不可欠であり、低度浸潤癌では血管新生により血管密度が増殖する。しかし、高度浸潤癌においては組織破壊性が高いため、既存の血管や新生血管を破壊し血管密度が低くなることが考えられる。

浸潤先進部における細胞動態と血管密度および浸潤様式との関係について評価するために、抗PCNA抗体を用いて検討した。その結果、PCNA陽性率と血管密度に関する検討では、血管密

度が高くなるにつれてPCNA陽性率は低値を示し、むしろ血管密度が高いもののほど増殖能が低い結果であった。またPCNA陽性率は、浸潤様式が1型から4C型になるにつれて高くなり、浸潤様式が高度な腫瘍は増殖活性が高いことが示された。血管が富んでいる腫瘍は、血流が豊富になり腫瘍細胞の栄養状態も良好で増殖能も高くなると思われ、本研究の結果は不合理に思われる。しかしながらNakamuraら<sup>38)</sup>は、血管密度と腫瘍細胞増殖能との間に相関を認めないと報告しており、本研究と一致している。これらの理由として、浸潤能の高い腫瘍は増殖活性が高く、PCNA陽性率も高くなるが、組織破壊性も強いため、浸潤部の血管も破壊され結果として血管密度が低くなるのではないかと推察された。よって腫瘍細胞自身の増殖活性は腫瘍血管には依存していないのではないかと考えられた。

一方、腫瘍とリンパ管数に関する報告では、かつてリンパ管数の増加は、腫瘍が誘導する現象とは考えられておらず、観察されるリンパ管は機能していないとされてきた<sup>39) 40)</sup>。しかし、近年リンパ管内皮細胞増殖因子としてVEGF-Cの存在の報告やリンパ管特異的のマーカースとしてDesmoplakin<sup>41)</sup>やLYVE-1 (lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor)<sup>42) 43)</sup>が開発され、リンパ管の増殖は腫瘍と関連したリンパ管新生とみなされ、浸潤や転移の相関について<sup>44)</sup>議論されているところである。本研究でリンパ管密度を算定した結果、正常粘膜から癌化する経時的な変化において若干リンパ管密度が増加する傾向にあったが、ほとんど変化がみられなかった。浸潤癌においても、浸潤様式1型、2型、3型でのリンパ管密度に変化はみられなかったが、高度浸潤癌の4C型では増加する傾向がみられた。これらの理由として、リンパ管の機能は、組織液の吸収を主としており、正常粘膜や低浸潤癌では細胞の代謝産物が少ないため、既存のリンパ管が組織液を十分に吸収できるものと推察できる。しかし、浸潤増殖が促進された浸潤癌において、細胞増殖と組織の破壊が繰り返し起こり、大量の組織液が産出するため、リンパ管密度が増加したのと考えられる。

口腔癌のVEGF-Cの発現と癌の悪性度について検討された報告は少なく、Kishimotoら<sup>45)</sup>の報告のみである。この報告において、臨床例ではVEGF-Cの発現と臨床病理学的因子およびリンパ節転移の関係について検討されているが、リンパ節転移にのみ相関が認められ、他はいずれにおいても有意な差は認められていない。本研究の結果では、浸潤様式とVEGF-Cの発現において浸潤様式が高度になるにつれてVEGF-Cの発現も高度になる傾向が認められ、特に、高度浸潤癌である4C型では強発現が観察された。すなわち、高度浸潤癌においてはマトリックスメタロプロテイナーゼ (matrix metalloprotease) 等の間質組織の破壊のための酵素が過剰発現し、リンパ管の破壊も進行しているが、VEGF-Cの発現も高度になり、リンパ管の新生も盛んになり、破壊を補うリンパ管新生が行われていると予想された。

以上の結果から、口腔癌の浸潤と増殖に伴い血管やリンパ管は破壊と新生を繰り返しながら、腫瘍を維持していると思われた。特に癌が誘導する血管新生とリンパ管新生は癌自身が浸潤・増殖するためには不可欠な存在であると考えられ、血管新生阻害剤やリンパ管新生阻害剤などによる新しい治療<sup>46) 47)</sup>についても応用が可能であると思われた。

## 結 論

口腔扁平上皮癌の浸潤増殖過程における血管新生およびリンパ管新生の変化とその意義の解明を目的として、実験的誘発ハムスター舌癌モデルを用い、腫瘍発生までの血管密度およびリンパ管密度の経時的な変化、各浸潤様式分類と血管密度およびリンパ管密度との関係、血管密度と腫瘍増殖動態との関係およびリンパ管密度とVEGF-Cの発現との関係について検討したところ以下の結論を得た。

1. 腫瘍発生までの経時的な変化と血管密度およびリンパ管密度の関係について検討したところ、血管密度では無処置6.9±1.4、処置2週目では9.8±1.3、処置6週目では11.5±1.0、処置12週目では13.6±1.5となり血管は経時的に増加する傾向であった。また、リンパ管密度においては無処置9.2±1.4、処置2週目9.3±0.8、処置6週目9.5±1.1、処置12週目9.7±1.8となり、リンパ管密度には変化は認められなかった。

2. 発癌を認めたハムスターは36匹で、肉眼的発育形態は外向性発育を示したものが28匹 (77.8%)、内向性発育を示したものが8匹 (22.2%) であった。組織型はすべて扁平上皮癌であり、ほとんどが高分化であった。浸潤様式別に分類した結果、1型8匹 (22.2%)、2型8匹 (22.2%)、3型15匹 (41.7%)、4C型5匹 (13.9%) であり、4D型の腫瘍は認められなかった。

3. 血管密度およびリンパ管密度を浸潤様式別に検討したところ、1型24.1±3.0、2型21.1±3.2、3型12.0±3.8、4C型9.4±4.7となり、浸潤傾向が高度になるにつれ血管密度は低くなる結果であった。一方リンパ管密度では、1型15.3±2.7、2型13.2±5.0、3型11.9±4.3、4C型17.6±5.4となり1、2、3型よりも4C型にリンパ管密度高くなる傾向がみられた。

4. 血管密度とPCNA陽性細胞率との関係について検討したところ、血管密度が高くなるにつれてPCNA陽性率は低くなり、逆相関を示す結果であった。

5. 浸潤様式とPCNA陽性細胞率との関係について検討したところ、浸潤様式1型では陽性率14.5±4.4、2型では陽性率16.5±3.0、3型では陽性率20.3±6.6、4C型では陽性率23.1±5.6であり、浸潤様式が高度になるにつれてPCNA陽性率は高くなる傾向がみられた。

6. 浸潤様式別にVEGF-Cの発現程度について検討したところ、浸潤様式が高度になるにつれてVEGF-Cの発現も高度になる傾向が認められた。

7. リンパ管密度とVEGF-Cの発現程度との関係について検討したところ、両者の間に関連性がみられず、統計学的にも有意な差は認めなかった。

以上の結果より、本研究における舌扁平上皮癌の血管新生およびリンパ管新生は、腫瘍を維持するために不可欠な存在と思われ、浸潤や増殖に深く関与していることが示唆された。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御指導と御校閲を賜りました恩師金沢大学大学院医学系研究科がん医科学専攻がん細胞学講座細胞浸潤学分野山本悦秀教授に深甚なる謝意を表します。また、直接御指導御教示を頂きました当講座の川尻秀一助手に深謝致します。さらに、本研究の遂行に当たり、御協力を頂きました当講座の中川清昌助教授をはじめ、田中彰博士、野口夏代博士、加藤広裕院生、長谷剛志院生および諸先生方各位に厚く御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) 小浜源郁, 野口誠, 木戸幸恵, 久保田裕美, 金城尚典, 宮崎晃亘. 口腔扁平上皮癌の臨床所見と病理組織所見に基づいた外科的療法. 日口腫瘍誌 13: 33-41, 2001
- 2) Jakobsson PA, Enoroth C, Killander D, Moberger G, Martensson B. Histological classification and grading of malignancy in carcinoma of the larynx. *Acta Radiol* 12: 1-8, 1973
- 3) Bryne M. Is the invasive front of an oral carcinoma the most important area for prognosis. *Oral Dis* 4: 70-77, 1998
- 4) Osaki T, Kimura T, Tatemoto Y, Dapeng L, Yoneda K, Yamamoto T. Diffuse mode of tumor cell invasion and expression of mutant p53 protein but not of p21 protein are correlated with treatment failure in oral carcinomas and their metastasis foci. *Oncology* 59: 36-43, 2000
- 5) Yamamoto E, Kohama G, Sunakawa H, Iwai M, Hiratsuka H. Mode of invasion, and lymph node metastasis in squamous cell carcinoma of oral cavity. *Cancer* 51: 2175-2180, 1983
- 6) 山本悦秀, 宮川明, 平塚博義, 熊谷茂宏, 小浜源郁. 口腔粘膜癌切除後の後発転移に関する検討. 癌の臨床 35: 815-824, 1989
- 7) Lauria R, Perrone F, Carlomagna C, De Laurentis M, Morabit A, Gallo C, Varriale E, Pettinato G, Panico L, Petrella G, Bianco AR, De Placido S. The prognostic value of lymphatic and blood vessel invasion in operable breast cancer. *Cancer* 76: 1772-1778, 1995
- 8) Folkman J. Tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res* 43: 175-203, 1985
- 9) Smith B.D, Smith G.L. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor protein levels in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol* 18: 2046-2052, 2000
- 10) Gasparini G. Prognostic value of vascular endothelial growth factor in breast cancer. *Oncologist* 5: 37-44, 2000
- 11) Folkman J. Angiogenesis and tumor growth. *N Engl J Med* 334: 920-921, 1996
- 12) Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T. Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 3566-3570, 1995
- 13) Yonemura Y, Endo Y, Fujita H, Fushida S. Role of vascular endothelial growth factor C expression in the development of lymph node metastasis in Gastric cancer. *Clin Cancer Res* 5: 1823-9, 1999
- 14) Akagi K, Ikeda Y, Miyazaki M, Abe T, Kinoshita J, Maehara Y. Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) expression in human colorectal cancer tissues. *Br J Cancer* 83: 887-891, 2000
- 15) Niki T, Ibe S, Tokunou M, Yamada T, Matsuno Y, Hirohashi S. Expression of vascular endothelial growth factors A, B, C and D and their relationships to lymph node status in lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 6: 2431-2439, 2000
- 16) Hashimoto I, Kodama J, Seki N, Hongo A, Yoshinouchi M, Okuda H. Vascular endothelial growth factor-C expression and its relationship to pelvic lymph node status in invasion cervical cancer. *Br J Cancer* 85: 93-97, 2001
- 17) Kitadai Y, Amioka T, Haruma K Tanaka S, Yoshihara M, Sumii K. Clinicopathological significance of vascular endothelial growth factor (VEGF-C) in human esophageal squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 93: 662-666, 2001
- 18) Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nat Med* 7: 192-198, 2001
- 19) Fujita K, Kaku T, Sasaki M, Onoe T. Experimental production of lingual carcinoma in hamsters by local application of 9, 10-dimethyl-1, 2-benzanthracene. *J Dent Res* 52: 327-332, 1973
- 20) 川尻秀一. 実験的誘発舌癌における浸潤増殖像の検討. 十全医会誌 102: 645-657, 1993
- 21) Kato S and Miyauchi R. Enzyme-histochemical visualization of lymphatic capillaries in the mouse tongue: light and electron microscopic study. *Okajimas Folia. Anat Jpn* 65: 391-404, 1989
- 22) Zimmermann H. 5'-nucleotidase; molecular structure and functional aspects. *Biochem J* 285: 345-365, 1992
- 23) Bonne C. Über geschwulste bei teertieren. *Krebs Forsch* 25: 1-22, 1927
- 24) Levy, B. M. The effect of a chemical carcinogen (20-methyl cholanthrene) on oral tissues. A preliminary report. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1: 582, 1948
- 25) Kolas, S. Investigation of normal human saliva for possible anticarcinogenic action and chemical carcinogenesis in mucous membranes. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 8: 1192-1203, 1995
- 26) 畑田憲一. 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO) 誘発ラット舌癌に対する peplomycin の抗腫瘍効果に関する実験的研究. 日口外誌 38: 1745-1765, 1992
- 27) Ohtake K, Shingaki S, Nakajima T. Histologic study on the metastatic process in the experimental model of lymph node metastasis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 75: 472-8, 1993
- 28) Kawashiri S, Kumagai S, Kojima K, Harada H, Yamamoto E. Development of a new invasion and metastasis mode of human oral squamous cell carcinomas. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 31: 216-221, 1995
- 29) Mori K. Identification of lymphatic vessels after intra-arterial injection of dyes and other substances. *Microvasc Res* 1: 268-74, 1969
- 30) 孝富士喜久生, 橋本謙, 児玉一成. 過酸化水素水による胃壁内リンパ管の検討. 日消化器外科誌 22: 2576-2581, 1989
- 31) Shimada T, Morita T, Oya M, Kitamura H. Morphological Studies of the cardiac lymphatic system. *Arch Histol Cytol* 53: 115-126, 1990
- 32) 中山温史. 誘発舌癌における毛細リンパ管の酵素組織化学的観察. 日口外誌 41: 104-113, 1995
- 33) 茶谷修平. 実験舌癌における腫瘍血管構築像の検討; 特に浸潤増殖像との関連について. 十全医会誌 107: 74-86, 1998
- 34) Williams JK, Calson GW, Cohen C. Tumor angiogenesis as a prognostic factor in oral cavity tumors. *Am J Surg* 168: 373-380, 1994
- 35) 新谷悟, Rafael A, 吉澤泰斗, 大月要, 松村智弘. ヒト扁平上皮癌における微小血管に関する免疫組織化学的検討. 日口外誌 40: 645-650, 1994
- 36) Gleich LL, Biddinger PW, Pavelic ZP. Tumor angiogenesis



in T1 oral cavity squamous cell carcinoma. *Head Neck* 18: 343-346, 1996

37) Gleich LL, Biddinger PW, Duperier FD. Tumor angiogenesis as a prognostic indicator in T2-T4 oral cavity squamous cell carcinoma; A clinical-pathologic correlation. *Head Neck* 19: 276-280, 1997

38) Nakamura G, Arita S, Tanaka K, Hioki K, Tsubura A, Shikata N. Correlation between microvessel density and tumor cell proliferation with clinical factors in breast carcinomas. *Oncol rep* 6: 1023-1027, 1999

39) Dumont AE. Factor VIII-related antigen. *J Nat Cancer Inst* 85: 674-676, 1993

40) Folkman J. Angiogenesis and tumor growth. *New Eng J Med* 334: 920-921, 1996

41) Ebata N, Nodasaka Y. Desmoplakin as a specific marker of lymphatic vessels. *Microvasc Res* 61: 40-48, 2001

42) Banerji S, Ni J, Wang S, Clasper S, Su J. LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor hyaluronan. *J Cell Biol* 144: 789-801, 1999

43) Maula S. M, Luukkaa M, Grénman R, Jackson D. Intratumoral lymphatics are essential for the metastatic spread and prognosis in squamous cell carcinomas of the head and neck region. *Cancer Res* 63: 1920-1926, 2003

44) 牧野修治郎. DMBA誘発ハムスター舌癌のリンパ節転移に関する組織化学的研究. *日口外誌* 47: 479-494, 2001

45) Kishimoto K, Sasaki A, Yoshihama Y, Mese H. Expression of vascular endothelial growth factor-C predicts regional lymph node metastasis in early oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 39: 391-396, 2003

46) Noguchi N, Kawashiri S, Tanaka A, Kato K, Nakaya H. Effect of fibroblast growth inhibitor on proliferation and metastasis of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 39: 240-247, 2003

47) Ueda N, Kamata N, Hayashi E, Yokoyama K, Hoteiya T, Nagayama M. Effects of an anti-angiogenic agent, TNP-470, on the growth of oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 35: 554-560, 1999

**Angiogenesis and Lymphangiogenesis in Experimentally Induced Tongue Carcinoma** Hiromitsu Nakaya  
Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University Kanazawa 920-8640 — *J. Juzen Med Soc.*, **112**, 160 — 168 (2003)

**Key words** Angiogenesis, Lymphangiogenesis, Experimentally-induced tongue carcinoma, Blood and lymph vessels densities, Mode of cancer invasion

#### Abstract

To elucidate changes in tumor blood and lymph vessels in cases involving the invasive growth of squamous cell carcinoma of the oral cavity, and its significance, blood and lymph vessels densities in tongue carcinomas induced in hamsters were investigated. Tongue cancer was induced by abrading the right margin of the tongue of each hamster with an endodontic barbed broach and subsequently applying 1.0% DMBA dissolved in acetone, three times a week, at the same site. Hamster was killed to untreated hamster and 2 week treatment hamster, 6 week treatment hamster, 12 week treatment hamster, to observed in a time-dependent manner from normal mucosa to treatment 12 week. And the procedures were continued after the 12 week of the experiment, after macroscopic detection of cancer and signs of cachexia had developed, blood vessel staining material was infused into the ascending aorta of each animal. Fresh frozen sections were prepared, and 5'-nucleotidase staining was used to visualize the lymph vessels. The effects on the blood vessels and lymph vessels were observed. Macroscopic tumor growth mode was exophytic in 28 animals and endophytic in 8 animals. The mode of invasion was Grade 1 in 8 animals, Grade 2 in 8 animals, Grade 3 in 15 animals, Grade 4C in 5 animals. Blood vessel density increased in a time-dependent manner from normal mucosa to cancerization, but lymph vessel density did not increase. And they were compared with in terms of the mode of cancer invasion. As tumor invasion progressed, the blood vessel density decreased ( $P<0.01$ ), but lymph vessel density tended to be higher in grade 4C than in grades 2, 3 ( $P<0.01$ ). The PCNA (proliferating cell nuclear antigen) of cancer cell, which is an indicator of tumor proliferation potential, was more frequently positive as tumor invasion became more severe. The PCNA positive rate increased as mode of invasion increased ( $P<0.01$ ). But the PCNA positive rate decreased as vessel density increased ( $P<0.01$ ). Thus, the vessel density was not proportional to the tumor proliferation potential. The expression of vascular endothelial growth factor-C was seen more frequently as tumor invasion progressed ( $P<0.01$ ). The present findings indicated that angiogenesis and lymphangiogenesis are affected by cancerous invasion.